

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002年11月28日 (28.11.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/095026 A1

(51) 国際特許分類7: C12N 15/09, 15/861, 5/10, A61K 35/76, 38/17, 48/00, A61P 43/00, 9/00

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 池田正明 (IKEDA, Masaaki) [JP/JP]; 〒113-0022 東京都文京区千駄木3丁目12番28号 Tokyo (JP). 安達三美 (ADACHI, Mimi) [JP/JP]; 〒164-0003 東京都中野区東中野2-18-1-307 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/08208

(74) 代理人: 加藤朝道 (KATO, Asamichi); 〒222-0033 神奈川県横浜市港北区新横浜3丁目20番12号 望星ビル7階 加藤内外特許事務所 Kanagawa (JP).

(22) 国際出願日: 2001年9月21日 (21.09.2001)

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

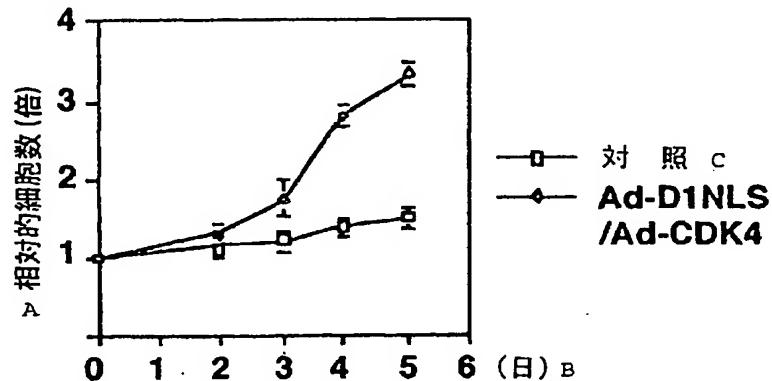
(30) 優先権データ:
特願2001-148266 2001年5月17日 (17.05.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 萬有製薬株式会社 (BANYU PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8416 東京都中央区日本橋本町2丁目2番3号 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF PROLIFERATING TERMINAL DIFFERENTIATED CELLS AND RECOMBINANT VECTOR THEREFOR

(54) 発明の名称: 終末分化細胞の増殖方法及びそのための組換えベクター



A...RELATIVE CELL NUMBER (FOLDS)

B...DAYS

C...CONTROL

(57) Abstract: Terminal differentiated cells are proliferated by transferring a cyclin and a cyclin-dependent kinase into the nuclei of the terminal differentiated cells and then culturing or maintaining the resultant cells. In particular, a method of proliferating terminal differentiated cells applicable to the treatment of heart diseases, etc. can be provided by adding a base sequence encoding a nuclear transport signal to at least one of a cyclin gene and a cyclin-dependent kinase gene, transferring these genes into terminal differentiated cells *in vitro* and then culturing the cells, or transferring the above-described genes directly into terminal differentiated cells *in vivo*. The cyclin as described above is a cyclin which is capable of activating CDK4 or CDK6, while the above-described cyclin-dependent kinase is one which is activated by D-type cyclin. Moreover, a recombinant vector usable in the above method and drugs containing the same are provided.

[続葉有]

WO 02/095026 A1



(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て:

- JPの指定のための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て(規則4.17(4))
- JPの指定のための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て(規則4.17(4))

添付公開書類:

- 國際調査報告書
- 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

サイクリン及びサイクリン依存性キナーゼを終末分化細胞の核内に導入し、次いでその細胞を培養又は保持することにより、終末分化した細胞を増殖させる。特に、サイクリン遺伝子及びサイクリン依存性キナーゼ遺伝子の少なくとも一方に核移行シグナルをコードする塩基配列を付加し、前記各遺伝子を試験管内で終末分化細胞に導入し次いでその細胞を培養するか、又は前記各遺伝子を生体内の終末分化細胞に直接導入することにより、心疾患等の治療に応用できるような終末分化細胞の増殖方法が提供される。上記サイクリンはCDK 4又はCDK 6を活性化することができるサイクリンであり、また、上記サイクリン依存性キナーゼはD型サイクリンにより活性化されるものである。また、本発明は、このような方法に用いる組換えベクター又はこれを含有する薬剤をも提供する。

明細書

終末分化細胞の増殖方法及びそのための組換えベクター5 技術分野

本発明は終末分化細胞の増殖方法及びこれに用いる組換えベクターに関し、詳しくはサイクリン及びサイクリン依存性キナーゼを用いて終末分化細胞を増殖させる方法等に関する。

10 背景技術

真核細胞の細胞周期はサイクリン依存性キナーゼ(CDK)によって制御される。これらは単独では活性をもたずサイクリンと呼ばれるサブユニットが結合してはじめて活性型となるリン酸化酵素群である。細胞周期における異なるプロセス(複製や有糸分裂への導入など)は、異なるCDKによって制御されるが、一般にCDKの発現量は細胞周期を通じて一定で、その活性はサイクリンの発現量に依存する。サイクリンは細胞周期の必要な時期に一過性に発現してCDKを活性化する。

更に、CDKの活性はCDKインヒビターと呼ばれる一連の阻害因子群によって調節されている。その一次構造上の特徴と、阻害するCDKの特異性からINK4 (Inhibitor of CDK4) ファミリーと、CIP/KIP (CDK interacting protein/kinase inhibitory protein) ファミリーの2群に大別されている。細胞周期の進行を車の運転にたとえるとCDKはアクセル、CDKインヒビターはブレーキの役割を果たす因子で、アクセルとブレーキが協調的に調節しあうことで、細胞周期の進行が決定されている。

25 静止期の細胞が細胞周期に入る際、D型サイクリンは増殖刺激に反応してG1中期から後期にかけて発現する。Ras/Raf-1/MAPKによりその転写が促進され、P13K (phosphatidylinositol 3-kinase) /Akt (protein kinase B) により分解が抑制されている。CDK4, 6はD型サイクリンと結合し、核内に移行しCAK (CDK-activating kinase) によるリン酸化を受け活性型となる。D型サイクリンは増

殖シグナルのいわば細胞内センサーで、増殖シグナルに応じてその発現が誘導され、シグナルを実際に細胞周期を進行させるCDK2、CDC2に伝える働きをするものと考えられている。D型サイクリン/CDK4, 6の細胞周期進行における役割は2つあると考えられている。1つはRB(網膜芽細胞腫遺伝子蛋白)をリン酸化し、その増殖抑制効果を解除する。もう1つはCIP/KIPをトラップする働きである。細胞内に単独でCIP/KIPが存在するとG1後期に出現するCDK2活性は阻害されてしまう。D型サイクリン/CDKはCIP/KIPと結合することで細胞内のこれらのインヒビターによるCDK2阻害活性を低下させると考えられている。

細胞周期のG1期においてCDKの標的となる基質はRBである。RBは多くのタンパク質と相互作用することが知られているが、その中で鍵となるのが転写因子E2Fである。E2Fは細胞周期の進行やDNA複製に必要な遺伝子の転写を制御し、例えばサイクリンEの転写を活性化し、サイクリンE/CDK2の作用を介してS期の開始に重要な働きをしている。RBは非リン酸化状態では、E2Fと強く結合し、E2FがDNA複製を促進しないように抑えている。RBは細胞周期を進行させるCDKによってリン酸化され、リン酸化されたRBはE2Fを抑制する作用を失い、不活性化される。近年、RBとE2Fにはそれぞれ類似したタンパク質が存在することが示され、RBファミリー、E2Fファミリータンパク質と呼ばれるようになった。その結果、細胞周期のG1からS期への進行は、RBとE2Fファミリータンパク質によって高度に制御されているプロセスであることが明らかになってきた。更に、このRB-E2F経路は、細胞の分化、癌化、アポトーシスなどの多くの生命現象に関与していることが明らかになってきた。例えば、上記RB等の不活性化が細胞周期調節の異常によって細胞の癌化へつながることが明らかとなり、このような細胞周期調節遺伝子の多くが癌抑制遺伝子として報告されている。

一方、心筋細胞、神経細胞等の終末分化細胞は、このような細胞周期から逸脱して静止期(G0期)と呼ばれる特別な状態にあることが知られている。これら終末分化細胞の一つである心筋細胞は生直後に増殖能を失う。そのため、心筋梗塞や拡張型心筋症によって心筋細胞の壊死、喪失が起こった場合、心筋細胞は再

生されない。従ってその後、心不全に陥ってさらには死亡する症例が多く、これらの心疾患の死亡率が非常に高い原因となっている。これまで心筋細胞はG0期で停止しており、細胞周期は進行しないものと考えられていたが、近年の研究によって心筋細胞にも細胞周期の調節機構が存在することが示唆され始めた。

5 例えば、アデノウイルスの発癌遺伝子であるE1Aは上記RBに結合することにより、E2F依存性の遺伝子の転写を促し、細胞のDNA合成を誘導する。ラット新生仔培養心筋細胞を用いて、E1Aが心筋細胞においてE2Fを遊離し、DNA合成及び脱分化を起こすかどうかを確かめたところ、E1AのみではDNA合成の誘導は明らかでなくアポトーシスが起こる。E1Bの共存下でE1Aが10 DNA合成を誘導することが報告されている (Kirshenbaum, L.A. ら、The Journal of Biological Chemistry 270巻、7791-7794頁、1995年参照)。

15 次にE2Fアデノウイルスを使用した結果、E2Fは心筋細胞において心筋特異的な遺伝子の発現を抑制し、DNA合成を誘導することが報告されている (Kirshenbaum, L.A. ら、Developmental Biology 179巻、402-411頁、1996年参照)。

一方、核移行シグナルをもたない野生型のサイクリンD1を過剰発現するトランジジェニックマウスでは、心筋細胞においてCDK4の発現レベルの上昇と共にDNA合成も認められるが、異常な多核細胞が増加することが報告されている20 (Soonpaa, M.H. ら、Clin. Invest. 99巻、2644-2654頁、1997年参照)。

25 このような一連の研究から、心筋細胞においてもDNA合成は認められ細胞周期が進行する可能性が示唆されるが、これに続く細胞の分裂や細胞数が増加したという報告は無く、アポトーシスへ誘導されることなく心筋細胞を増殖させる方法は実質的に知られていない。

近年、臓器移植や白血病等の治療を目的として、胚性幹細胞 (ES細胞) と呼ばれる、いろいろな細胞に分化する能力を秘めた万能細胞を用いて所望の種類の細胞を作り出す再生医療技術が研究されている。しかし、ES細胞は胎児になる可能性がある胚を壊してつくるため、研究には倫理面からの抵抗が強い。

発明の課題

本発明は、上記問題点に鑑みなされたものであって、心筋細胞等の終末分化した細胞の再生を可能にして、心疾患等の治療に応用できるような終末分化細胞の増殖方法を提供することを目的とする。

また、このような方法に用いる組換えベクター又はこれを含有する薬剤を提供することを目的とする。

発明の開示

上記課題を解決するために、本発明者等は終末分化した細胞における細胞周期調節機構、特に心筋細胞において、血清などの増殖刺激を加えた場合におけるサイクリン/CDKの役割について研究を行なった結果、増殖刺激によって誘導されたD型サイクリン/CDK 4は細胞質に限局し核内へ移行しないこと、そのターゲットであるRBのリン酸化及びサイクリンE/CDK 2の活性化が起こらないことを見出した。そこで、サイクリンD 1に核移行シグナル(NLS)を付加した遺伝子とCDK 4をコードする遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを作成し、培養心筋細胞に感染させたところ、サイクリンD1/CDK 4が核内に発現し、RBのリン酸化を介して心筋細胞の増殖、分裂を起こすことを見出し、本発明を完成するに到った。

すなわち、本発明の第一の視点において、サイクリン及びサイクリン依存性キナーゼを終末分化細胞の核内に導入し、次いでその細胞を培養又はその組織を保持することを特徴とする。

上記核内へ導入するための好ましい態様において、サイクリン遺伝子及びサイクリン依存性キナーゼ遺伝子の少なくとも一方に核移行シグナルをコードする塩基配列を付加し、前記各遺伝子を終末分化細胞に導入し次いでその細胞を培養するか、又は前記各遺伝子を生体内の終末分化細胞に直接導入することを特徴とする。

更に本発明の好ましい態様において、上記サイクリンはCDK 4又はCDK 6を活性化することができるサイクリンであり、例えば哺乳類のサイクリンD 1、

D 2 及びD 3 等が好適である。また、上記サイクリン依存性キナーゼはD型サイクリンにより活性化されるものであり、例えば哺乳類のCDK 4 及びCDK 6が好適である。

本発明の別の好ましい態様において、前記終末分化細胞は心筋細胞、神経細胞
5 、腎臓細胞又は臍臓細胞であることを特徴とする。

更に別の好ましい態様において、前記終末分化細胞への導入はアデノウイルス
ベクターを用いた遺伝子導入であることを特徴とする。

本発明の第二の視点において、上記目的を達成するために用いられる組換えベ
クターは、核移行シグナル（タンパク質を核内に移行させる機能があるシグナル
10 ペプチド）をコードする塩基配列を付加したサイクリン遺伝子、又は核移行シグ
ナルをコードする塩基配列を付加したサイクリン依存性キナーゼ遺伝子を含むこ
とを特徴とする。上記組換えベクターは、少なくとも一方に核移行シグナルをコ
ードする塩基配列が付加されていれば、サイクリン遺伝子とサイクリン依存性キ
ナーゼ遺伝子の両方を含んでいてもよい。

15 好ましい態様において、上記サイクリン遺伝子は哺乳類のCDK 4 又はCDK
6 を活性化し得るサイクリン遺伝子であり、上記サイクリン依存性キナーゼ遺伝
子は哺乳類のサイクリンD 1 、D 2 又はD 3 によって活性化されるサイクリン依
存性キナーゼ遺伝子であることを特徴とする。

更に好ましい態様において、前記組換えベクターはアデノウイルスベクターで
20 あり、前記核移行シグナルをコードする塩基配列はSV 40 のlarge T 抗原由來
の核移行シグナルの塩基配列であることを特徴とする。特にSV 40 のlarge T
抗原由來の核移行シグナルを3回コードするものが推奨される。

本発明の第三の視点において、上記第一の視点における何れかの方法により増
殖させたことを特徴とする動物細胞又は組織に関する。

25 更に、本発明の第四の視点において、上記第二の視点におけるいずれかの組換
えベクターを有効成分とすることを特徴とする終末分化した細胞及び／又は組織
を増殖させるための薬剤に関する。

本視点における薬剤を使用する好ましい態様としては、心臓疾患有する患者
の治療方法であって、少なくとも一方に核移行シグナルをコードする塩基配列が

付加されたサイクリン遺伝子及びサイクリン依存性キナーゼ遺伝子を発現させるウイルスベクターを直接患者の心臓（心筋）に投与し、患者の心筋（心筋細胞）を増殖させることを特徴とする。

5 図面の簡単な説明

図1は、種々の増殖刺激による心筋細胞のサイクリンD1の発現とRBのリン酸化をウエスタンプロット解析した図である。略称は次の通りである。ppRB：リン酸化されたRB蛋白質、pRB：RB蛋白質、

図2は、種々の増殖刺激による心筋細胞のD型サイクリンとCDK4の発現を10細胞質と核のそれぞれの抽出物に分けてウエスタンプロット解析した図である。略称は次の通りである。RB：RB蛋白質、

図3は、種々の増殖刺激によって誘導された心筋細胞におけるサイクリンD1の細胞内の局在性をマウス抗sarcomericアクチンモノクローナル抗体を用いて免疫蛍光染色した顕微鏡写真である。

15 図4は、サイクリンD1への核移行シグナルの付加によって、心筋細胞の核内へのサイクリンD1の移行をウエスタンプロット解析した図である。

図5は、種々の組換えアデノウイルスにより発現させたサイクリンD1及びCDK4の心筋細胞内での局在性をウエスタンプロット解析した図である。

20 図6は、種々の組換えアデノウイルスを感染させた心筋細胞内のRBのリン酸化をウエスタンプロット解析した図である。略称は次の通りである。ppRB：リン酸化されたRB蛋白質、pRB：RB蛋白質、

図7は、組換えアデノウイルスを感染させた心筋細胞核内でのサイクリンA及びサイクリンEの発現をウエスタンプロット解析した図である。

25 図8は、レーザースキャンサイトメーター（LSC）により種々の増殖刺激を受けた心筋細胞の細胞周期を解析した結果を経時的に示した図である。

図9は、細胞分裂中の心筋細胞を共焦点レーザー顕微鏡（confocal laser microscope）を備えたLSCにより解析した結果を示した写真及び図である。

図10は、ウイルス感染後の心筋細胞の細胞数を経時的に計測した結果を示した図である。

図11は、D1NLS/CDK4（a及びb）又はlacZ遺伝子（c）を含む組換えアデノウイルスを生体内においてラット心臓に感染させ、その心臓組織切片を免疫蛍光染色して発現タンパク質を視覚化した図である。図中、赤色はsarcomeric actinを、緑色はKi-67タンパク質を、バーの長さは20 μmを表す。

5 なお、上記各図面において用いられる符号は以下の内容を意味する。

+：各種の増殖因子を添加し、又は各種の組換えアデノウイルスを感染させたことを示す。

-：各種の増殖因子を添加せず、又は各種の組換えアデノウイルスを感染させなかつたことを示す。

10

発明の実施の形態

（サイクリン及び該サイクリン依存性キナーゼ）

哺乳類のD型サイクリンは3種類（D1, D2, D3）のサブタイプを有し、細胞周期のG1中期から後期にかけて発現し、CDK4, CDK6と結合して活性化する。おもにRBタンパク質をリン酸化してG1/S期移行を促進する。サイクリンD1はG1期には核内に局在するが、S期に入るとGSK-3β（glycogen synthase kinase-3β）と呼ばれるタンパク質キナーゼによってThr286をリン酸化されて細胞質へ移行しそのままプロテアソームによって分解される。サイクリンD1/CDK4は細胞周期以外にも転写制御因子MyoDの阻害を通じて筋分化を制御したり、乳腺上皮細胞においてER（estrogen receptor）と結合して活性化するなどの多彩な機能が報告されている。

本発明は、このようなサイクリン及びサイクリン依存性キナーゼを終末分化細胞の核内に導入することにより、細胞周期を進行させて終末分化細胞を増殖させる方法である。これらのタンパク質を核内に導入する方法としては、マイクロインジェクションにより物理的に注入する方法もあるが、導入効率の観点から遺伝子導入法が好ましい。導入されるサイクリンとしてはCDK4又はCDK6を活性化できるものであれば良く、例えば上記3種類のサブタイプ（サイクリンD1, D2, D3）が挙げられる。また、サイクリン依存性キナーゼとしてはD型サイクリンによって活性化されるものであれば良く、CDK4又はCDK6等が挙

げられる。

(終末分化細胞の調製)

本発明の方法に使用される終末分化細胞は、生体から種々の方法により分離し、培養することができる。終末分化細胞とは、心筋細胞、神経細胞、腎臓細胞及び胰臓細胞等のように、生まれてから個体が死ぬまで一度も分裂しないで細胞周期のG0期にある細胞のことを言い、例えば、生後1～2日の新生仔ラットの培養心筋細胞は、フローサイトメトリー等の細胞周期アッセイを行うと、培養後24時間以内には90%以上の細胞がG0/G1期にあることが確認される。更に、血清などの増殖刺激を加えた際にもS期への移行は認められない。(Claycomb, W. C., Trends Cardiovascular Medicine 2巻、231～236頁、1992年参考)。

同様に神経細胞、特に脳等の中核神経細胞は胎児期において細胞分裂が完了するため、生後脳に障害を受けた場合は回復が困難である。腎臓細胞が障害を受けると再生することができず人工透析等の治療が必要となる。胰臓細胞は種々の消化酵素又は消化管ホルモンを産生するが、β細胞に障害を受けると再生が困難なためインシュリンの分泌に支障をきたし糖尿病の原因になることが知られている。本発明においては、これらの終末分化細胞を生体外に取り出して、又は生体内的そのままの状態で本発明の方法を適用し、培養又は保持することによって増殖させることができる。

(組換えベクターの構築)

D型サイクリン遺伝子及びサイクリン依存性キナーゼ遺伝子は、既にヒトを始め種々の生物からクローニングされ、その塩基配列が報告されている。例えば、マウスサイクリンD1遺伝子の塩基配列は、Matsushime, H.ら、Cell、65巻、701～713頁、1991年等に報告され、GenBankに登録されている (Accession No. M64403)。また、ヒトサイクリンD1遺伝子もLee, D.ら、Cell、66巻、1197～1206頁、1991年等に報告されている。ヒトCDK4は303個のアミノ酸からなるタンパク質であって、これをコードするcDNA配列は、GenBankに登録されている (Accession No. M14505)。さらに、哺乳類のゲノムDNAを鋳型として、所望の遺伝子に特異的なプライマーDNAを用いたPCR

により取得することもできる。

これらの遺伝子にコードされるタンパク質を終末分化細胞の核内に導入するためには、細胞質内で合成されたタンパク質を核内に移行させることが必要となる。このためには、上記各遺伝子の少なくとも一方、好ましくはサイクリン遺伝子に核移行シグナルをコードする塩基配列を付加する。現在、核移行シグナルと考えられるものには3種類が知られている。これらはいずれもモチーフと呼ばれる共通の配列をもつとされている。

第一は、リジンやアルギニン等の塩基性のアミノ酸をほとんどもたないタイプである。このモチーフの例は非常に少ないが、例えばインフルエンザウイルスの nucleoprotein の核移行シグナル (AAFEDLRVLS : 配列番号 1) がある (Davy, J. ら、 Cell 40巻、667-675頁、1985年参照)。第二は、塩基性アミノ酸を多く含むタイプである。このモチーフの例は非常に多く、例えば SV40 large T 抗原の核移行シグナル (PPKKKRKV : 配列番号 2) がある (Kalderon, D. ら、 Nature 311巻、33-38頁、1984年参照)。第三は、塩基性アミノ酸が約10アミノ酸を隔ててクラスターを作っているタイプで、Bipartiteタイプの核移行シグナルと呼ぶ。このモチーフの例も非常に多く、例えばアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の nucleoplasmin の核移行シグナル (KRPAATKKAGQAKKK : 配列番号 3) がある (Robbins, J. ら、 Cell 64巻、615-623頁、1991年参照)。

核移行シグナルをコードする塩基配列は、D型サイクリン遺伝子及び該サイクリンにより活性化されるサイクリン依存性キナーゼ遺伝子の少なくとも一方に付加する。これらの遺伝子によって発現された2つのタンパク質は細胞質内で複合体を形成するから、何れか一方、好ましくはサイクリン遺伝子に核移行シグナルを有すれば該複合体が核膜を通過することができる。なお、これらの核移行シグナルをコードする塩基配列を有し、クローン化したDNAの発現タンパク質を核内に移行させるための組換えベクターは容易に入手することができ、例えば、 SV40 large T 抗原の核移行シグナルを有する発現プラスミド pEF/myc/nuc は、 Invitrogen社から市販されている。

ベクターとしては、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、

ワクシニアウイルス、ニワトリポックスウイルス、SV40のごときパボバウイルス等のウイルス由来のベクターが例示される。

本発明の好ましい形態において用いられるアデノウイルスベクターは、ヒト胎児腎臓293細胞又は大腸菌を使用し、相同組換えによる方法 (Miyake, S. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93巻、1320頁、1996年参照) や簡単な *in vitro* ライゲーションによる方法 (Mizuguchi, H. ら、Hum. Gene Ther., 9巻、2577-2583頁、1998年参照) により調製することができる。アデノウイルスは線状の二本鎖DNAゲノムを有するDNAウイルスの一つであり、最も良く研究されているのは、ヒトアデノウイルス抗原型5(AD5)と抗原型2(AD2)である。これらの野生型アデノウイルスの初期遺伝子1(E1)及び3(E3)の大部分を欠失することにより、複製能のないアデノウイルスベクターを作製することができ、ウイルス粒子形成に有害な作用を及ぼすことなく、数kbの外来DNAを挿入することが可能となる。この組換えアデノウイルスは、転写調節因子であるE1遺伝子を欠いているが、挿入した遺伝子特異的な転写ユニットによって、標的細胞の増殖や、その他のウイルス遺伝子の有無に依存せずに、挿入した目的遺伝子のみを発現させることができる。このような発現系を構築するために、たとえば宝酒造株式会社からAdenovirus Expression Vector Kitが市販されており本願発明に利用可能である。

(遺伝子導入と細胞の培養)

遺伝子導入方法としては、従来より公知の方法が使用可能であり、例えばリン酸カルシウムやリポソームを使用した組換えDNAによるトランスフェクション法やレトロウイルス等の種々のウイルスを用いた遺伝子導入法がある。レトロウイルスによる遺伝子導入は、通常特定の細胞に感染して遺伝情報を細胞自体のDNAに組込むが、2種以上の細胞に感染できる場合もある。導入された遺伝子の発現は一過性発現であっても良く、また、受容細胞の染色体DNAに組込まれて構成的に発現しても良い。好ましくは、組換えアデノウイルスベクターを使用することによって、効率的な遺伝子導入と導入した遺伝子の高レベル発現を行うことができる。アデノウイルスによる遺伝子の導入は、哺乳動物の細胞に遺伝子を導入する最も強力な方法の一つであり、事実上すべての種類のヒト細胞及び多く

の非ヒト細胞に導入するために使用できる。また、アデノウイルスによる感染は細胞周期に依存しないため、様々な初代培養細胞系および形質転換細胞系で遺伝子を発現させることができる。特に終末分化細胞のようにDNA合成や細胞分裂を起こさない細胞でも効率良く遺伝子導入ができる。感染後に多くの細胞が組換えDNAのコピーを複数受け取ることから、導入された遺伝子は一時的に高レベルに発現する。更に、通常アデノウイルスDNAは細胞ゲノムに組込まれず、エピゾームとしてとどまる。その結果、アデノウイルスを使用した場合には、外来DNAが宿主細胞ゲノムに組込まれた時にランダムに発生する突然変異誘発性のエラーは殆ど生じないという利点もある。

10 本発明においては、D型サイクリン遺伝子と該サイクリンによって活性化されるサイクリン依存性キナーゼ遺伝子の両方を発現させるために、これらを同一の組換えウイルスによって感染させることも、又は別々の組換えウイルスによって感染させることもできる。2種類の組換えウイルスによって共感染させる場合は、これらを同時に感染させても良いし、一定時間をおいて別々に感染させても良い。本発明においては、感染させるウイルス量は例えば $10^9 \sim 10^{11}$ /mlのウイルス保存液を用い、細胞当たり好ましくは100個程度(MOI=100)に調整することにより感染させる。タイプの異なる2種の組換えアデノウイルスの共感染によっても、遺伝子導入の効果が高く、また、細胞の生存率が高い状態を得ることができる。なお、ウイルス量の測定(力価測定)は、プラークアッセイにより容易に行うことができる。

20 D型サイクリンと、該サイクリンにより活性化されるサイクリン依存性キナーゼとを核内において発現する終末分化細胞は、従来より公知の方法に従って培養することにより増殖させる。該細胞の培養方法は細胞の種類によってそれぞれ好適な方法を選択することができ、マイクロタイタープレート、ペトリ皿又はフラスコ中の静置培養や培養びんを用いた回転培養、さらに微小担体培養等の方法がある。例えば心筋細胞の場合は、イーグルの最小必須培地(MEM)等を用い、5~20%の牛胎児血清等の増殖因子を添加し、5%炭酸ガス存在下、37°Cで培養することができる。神経細胞、腎臓細胞及び膵臓細胞等も同様の方法により培養できる。各種細胞をそれぞれ最適の条件で増殖させるために種々の培地が開発、市販

されている。例えば、RPMI1640培地やCMRL1066培地等がある。このような多くの培地はFlow Laboratories社や、Gibco社等の市販業者から入手できる。

また、本発明においては、上述した種々の方法によって生体内、例えば哺乳動物の終末分化細胞又は組織に直接遺伝子を導入し、該細胞又は組織を生体内で保持することによっても増殖させることができる。ここで、「保持する」とは、体温や血流等の生理的な環境において、該細胞や組織の生理的な機能を損なうことなく維持し、細胞を増殖させることをいう。

(増殖した細胞又は組織)

本発明はまた、本発明の方法により増殖させたことを特徴とする細胞又は組織に関する。例えば患者から摘出された終末分化細胞に核移行シグナルを付加したD型サイクリン遺伝子と該サイクリンによって活性化されるサイクリン依存性キナーゼ遺伝子を上述した方法で導入し、培養することによって増殖させる。これらの増殖した細胞又は組織は、当該細胞又は組織の壊死した患者に投与してその再生を図るために用いることができる。具体的には、本発明の方法により増殖させた心筋細胞、神経細胞、腎臓細胞又は膵臓細胞などを患者に移植することができる。

(終末分化した細胞及び／又は組織を再生させるための薬剤)

本発明の組換えベクターは、疾病の予防又は治療に使用することができ、特定の細胞や組織が障害を受けた場合に、そのような細胞又は組織に本発明に係る組換えベクターを有効成分とする薬剤を投与することによって、終末分化した細胞を増殖させて壊死した組織又は臓器の修復、補充をさせることができる。例えば、心筋梗塞や拡張型心筋症の治療に用いることができ、この場合には患者の心臓に直接、上記組換えベクターを含む薬剤を投与することによって患者の心筋（心筋細胞）を増殖させることができる。

25

実施例

以下、終末分化細胞の一つである心筋細胞を用いた実施例により本発明をさらに具体的に説明する。この実施例においては、ラット心筋細胞を試験管内で増殖させる一実施形態を示す。ただし、本発明はこれら実施例に限定されるものでは

ない。

[実施例 1] 組換えアデノウイルスの調製

1) Ad-CDK4の調製

5 CDK 4を含むアデノウイルスベクターAd-CDK4は、プラスミドpCMV-CDK4 (Massachusetts General Hospital Cancer CenterのSander van den Heuvel博士より入手、van den Heuvelら、Science、262巻、2050-2054頁、1993年参照) から切り出したマウスCDK 4遺伝子とアデノウイルス構築キット
10 (宝酒造社製 Adenovirus Expression Vector Kit Code No. 6150) を用いて調製した。すなわち、pCMV-CDK4をBamHIで切断し、約920塩基対のDNA断片を調製した。この断片の末端をDNA Blunting Kit 宝酒造社製 Code No. 6025を用いて平滑(Blunt end)化した後、コスミドpAxcwのSwaI部位に挿入してコスミドpAd-CDK4を作製し、さらに斎藤らの方法 (Miyake, S. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93巻、1320頁、1996年参照) に従ってこのコスミドとヒトアデノウイルス5型のDNA-TPC (ターミナルペプチドコンプレックス) とをヒト胎児腎臓由
15 来の293細胞 (以下「293細胞」という。) へトランスフェクションさせることにより、組換えアデノウイルス(Ad-CDK4)を作製した。

2) Ad-D1NLSの調製

核移行シグナル(NLS)をコードする塩基配列を付加したサイクリンD 1遺伝子
20 を含むプラスミドは、pRSV-cyclinD1 由来のマウスサイクリンD 1遺伝子断片 (Matsushima, H. ら前掲参照) とpEF/myc/nucプラスミド (Invitrogen社製) 由来のNLSを連結して構築した。すなわち、プラスミドpEF/myc/nucを制限酵素NcoI及びXhoIで切断し、1.0%アガロースゲル電気泳動とQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製、Cat. 28704) を用いて約5.5 kbの第一のDNA断片を調製した。

25 次にプラスミドpRSV-cyclinD1を制限酵素NcoIで切断し上記と同様の方法で603 bpの第二のDNA断片を調製した。更に、プラスミドpRSV-cyclinD1を鑄型として以下の2種類のプライマーを用いてPCRを行い、マウスサイクリンD 1遺伝子のC末端側をコードする第三のDNA断片を調製した。

NcoIプライマー：5' ACCCTCCATGGTAGCTGCTGGGA 3' (配列番号4) 及び、

XbaIプライマー：5' TGATCTCGAGGTCGATGTCCACATCTGCACGT 3' (配列番号5)。

これらの3種類のDNA断片をDNA Ligation Kit 宝酒造社製 Code No. 6022を用いて連結することによってマウスサイクリンD1遺伝子のC末端側にSV40 Large T抗原由来の核移行シグナル(NLS)を重複して3回コードする塩基配列を有するプラスミドを構築した。このプラスミドから制限酵素PmaCI及びSmaIで切り出したDNA断片を上記と同様の方法によりコスミドpAxcwのSwaI部位に挿入し、アデノウイルス構築キット(宝酒造社製 Adenovirus Expression Vector Kit Code No. 6150)を用いて組換えアデノウイルス(Ad-D1NLS)を作製した。この組換えアデノウイルスAd-D1NLSは、E1およびE3遺伝子を欠失したアデノウイルスのDNA配列の中に、CAGプロモーター(トリ β -アクチンプロモーター+サイトメガロウイルスエンハンサー)と、ウサギ β -グロビン遺伝子のポリA付加シグナル配列の間に上記核移行シグナルをコードする塩基配列を付加したマウスサイクリンD1遺伝子を有する。

3) ウィルス保存液の調製

293細胞をコラーゲンコートした6cmシャーレにそれぞれ1枚ずつ培養しておく。上記1)及び2)で調製したコスミドAd-CDK4とAd-D1NLSの4 μ gを、それぞれ制限酵素処理済みDNA-TPC(宝酒造社製 Adenovirus Expression Vector Kit内)2.5 μ lと混合し、それぞれ6cmシャーレで培養した細胞にリポフェクション法でトランスフェクションを行った(FuGENETM 6 Transfection Reagent, Roche社製、cat#1814443を使用)。翌日、細胞を剥がし、回収した細胞懸濁液を、それぞれコラーゲンコート96ウエルプレートに播き直した。ウィルスが増殖し細胞が死滅したウエルが7~15日の間に現れたので、細胞が完全に死滅したウエル毎に培養液を無菌的に滅菌チューブに移して、凍結融解を6回繰り返し、5000 rpm, 5分間遠心分離した上清を1次ウィルス液として-80°Cで保存した。この1次ウィルス液10 μ lをコラーゲンコートした24ウエルプレートに培養した293細胞に感染させ、3~4日後に死滅した細胞/培養液を無菌的に滅菌チューブに移して、凍結融解を6回繰り返し、5000 rpm, 5分間遠心分離した上清を2次ウィルス液として-80°Cで保存した。この2次ウィルス液15 μ lを、コラーゲンコートした25cm²ボトルに培養した293細胞に感染させ、3~4日後に死滅

した細胞／培養液を無菌的に滅菌チューブに移して、凍結融解または密封型ソニケーターで破碎してウイルスを遊離させた。3000 rpm, 10分間、4°Cで遠心分離した上清を3次ウイルス液として-80°Cで保存した。この3次ウイルス液50 μlを、コラーゲンコートした75cm² ポトルに培養した293細胞に感染させ、3～5日後に死滅した細胞／培養液を無菌的に滅菌チューブに移して、凍結融解または密封型ソニケーターで破碎してウイルスを遊離させた。3000 rpm, 10分間、4°Cで遠心分離した上清を4次ウイルス液として-80°Cで保存した。この4次ウイルス液の力価は293細胞を用いてplaque assayにより決定したところ、いずれも常に10⁹～10¹¹ pfu/mlの範囲内であった。

10

[実施例2] 心筋細胞の調製と組換えアデノウイルスの感染

生後1～2日後のラット (Sprague-Dawley (SD) rats) から心筋細胞を分離し、パーコール濃度勾配遠心分離によって心筋細胞の層 (画分) を回収し、5%牛血清 (CS) を含むMEM (minimum essential medium; Sigma社製、Cat. M-4655) に分散した (Tamamori, M. ら、Am. J. Physiol. 275巻 (Heart Circ. Physiol. 44巻)、H2036-H2040頁、1988年参照)。このようにして得られた細胞の95%以上は、マウスモノクローナル抗アクチン抗体 (Dakopatts社製、デンマーク) を用いた免疫染色によって心筋細胞であることを確認した。この新生仔ラット心筋細胞は、5%牛胎児血清 (FCS, Flow Laboratories社製) を添加したイーグル最小培地 (MEM, Flow Laboratories社製) 中で培養皿に播種し、炭酸ガスインキュベータ中、37°Cで24時間培養した。次の日、培養液を無血清イーグル最小培地 (MEM) に交換し、更に24時間培養した後、実施例1で調製した各々のウイルスを単独で又は2種以上を組み合わせて感染させた。ウイルス感染は、細胞当たり100 pfu (plaque forming unit) の組換えアデノウイルスを加え一定期間培養した。対照として、ラット心筋細胞の代わりに纖維芽細胞の一種であるREF52細胞を用いて同様の実験を行った。

[実施例3] ウエスタンプロット解析、リン酸化反応解析及び免疫蛍光染色による心筋細胞における遺伝子発現の解析

種々の増殖因子及び／又は実施例1で調製した各種の組換えアデノウイルスを、実施例2で示した方法で調製したラット心筋細胞に感染させた。これらのウイルス感染細胞を培養後、所定時間後の培地から、細胞全体、細胞質分画及び核分画をそれぞれ次のような方法で抽出した。培養皿上の細胞を氷冷した(4℃)PBS (Phosphate buffered saline)にて洗浄した後、セルスクレイパーにてかき取り、遠心分離して上清を捨てた。得られた沈殿を少量のPBSでもう一度洗浄した後、1.5 mlのエッペンドルフチューブに移し、沈殿の10倍容量の氷冷した(4℃)Lysis Buffer (50 mM HEPES (pH7.9), 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.1% NONIDET P-40, 0.4 mM NaF, 0.4 mM Na₂VO₄, 10% glycerol)を加え、氷上にてピペッティングし、15秒間vortex mixerで攪拌した後30分間氷上にて静置した。その後、4℃、15,000回転にて10分間遠心分離し、その上清を細胞全体の抽出物として保存した(液体窒素にて急速冷凍し、-80℃にて保存した)。

細胞質タンパク質と核タンパク質は次のように分画した。上記と同様に、培養皿上の細胞を氷冷したPBSにて洗浄した後、セルスクレイパーにてかき取り、遠心分離して上清を捨てた。得られた沈殿を少量のPBSでもう一度洗浄した後、1.5 mlのエッペンドルフチューブに移し、沈殿の5倍容量の氷冷したBuffer A (10 mM HEPES (pH7.9), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT)にてピペッティングし、15秒間vortex mixerで攪拌した後氷上にて10分間静置した。NONIDET P-40を最終濃度0.2%になるように加えvortex mixerで攪拌した後5分間氷上にて静置した。最後に5,000回転にて5分間遠心分離した上清を細胞質分画として保存した(液体窒素にて急速冷凍し、-80℃にて保存した)。沈殿は等容量のBuffer C (20 mM HEPES (pH7.9), 25% glycerol, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA)にてピペッティングし、15秒間vortex mixerで攪拌した後30分間氷上にて静置した。最後に15,000回転にて10分間遠心分離した上清を核分画として保存した(液体窒素にて急速冷凍し、-80℃にて保存した)。なお、上記Lysis Buffer, Buffer A及びBuffer Cにはいずれも使用直前に、1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml leupeptin, 1 μg/ml pepstatin (いずれもSigma社にて購入)を追加した。

上記の方法で抽出したタンパク質は、各サンプルごとに同じ数の細胞から抽出

されたように補正した。すなわち、一サンプル当たり 1×10^6 個から抽出したタンパク質を6%又は11% SDS-PAGE GELにて電気泳動した後、ニトロセルロース膜にトランスファーし、5% スキンミルク、0.2% Tween20を含むPBSに浸して1時間振とうした（ブロッキング）。この溶液に、マウスモノクローナル抗サイクリンD 1抗体 (Ab-3; Oncogene science社製)、マウスモノクローナル抗RB抗体 (1400 1A Pharmingen社製)、ウサギポリクローナル抗サイクリンA抗体 (SC-751; Santa Cruz Biotechnology社製)、ウサギポリクローナル抗サイクリンE抗体 (SC-481; Santa Cruz Biotechnology社製)、及び／又はウサギポリクローナル抗CDK 4抗体 (SC-260; Santa Cruz Biotechnology社製) を加えてさらに1時間振とうし、5% スキンミルク、0.2% Tween20を含むPBSにてこれらの抗体を洗浄した後、2次抗体としてヒツジ抗マウスIg, horseradish peroxidase linked whole antibody (Amersham LifeScience; NA931) 又はヒツジ抗ウサギIg, horseradish peroxidase linked whole antibody (Amersham LifeScience; NA934) と反応させ、5% スキンミルク、0.2% Tween20を含むPBSにて洗浄後、ECLキット (Western blotting detection reagents; Amersham LifeScience; RPN 2109) を用いて免疫蛍光染色し、ウエスタンプロット解析を行った。

まず最初に増殖因子としての血清と、 α アドレナリン作用性受容体アゴニストであるPE (Phenylephrine) と、心肥大因子として働く活性型Rasタンパク質を発現する組換えアデノウイルスAd-Ras61L (Duke University Medical CenterのNevins, J. R. 博士から入手した。Leone, G. ら、Nature、387巻、422-426頁、1997年参照) を用いて心筋細胞を刺激した時のサイクリンD 1の発現とRBのリン酸化の有無をウエスタンプロット解析により調べた。図1は、心筋細胞にAd-Ras61L又は対照としてRas遺伝子を含まないアデノウイルスAd-Conを感染させ、18時間後に培養液を10%血清、 10^{-6} MのPE (Phenylephrine) を含む培地又は無血清培地に置換してさらに18時間培養した後、細胞抽出物を電気泳動し、各抗体により染色した結果を示した。図1に示したように、これらの刺激によって心筋細胞でサイクリンD 1とCDK 4（データ示さず）の発現が誘導されることが分かる。サイクリンD 1とCDK 4の蓄積にもかかわらず、心筋細胞ではサイクリンD 1に関連したキナーゼは活性化されず（データ示さず）、RBタンパク

質もリン酸化されなかった。これに対し、対照として用いたREF52細胞では、リン酸化により高分子量側にシフトしたバンド (ppRB) が検出されたことから、RBが高度にリン酸化されていることが分かる。増殖している細胞においては、D型サイクリンの発現に伴ってRBタンパク質がリン酸化されるが、心筋細胞ではこれに反してRBはリン酸化されなかった。これらの結果は、増殖刺激に対する心筋細胞の反応はRBタンパク質のリン酸化が起らない点において増殖している細胞とは異なることが理解される。

サイクリンD1が細胞内に蓄積しているにもかかわらず、どうしてRBのリン酸化が起こらないのかを調べるために、D型サイクリン及びCDK4の細胞内における局在性を検討した。図2は、心筋細胞及びREF52細胞から抽出した細胞質分画と核分画をウエスタンプロット解析により調べた結果である。各種の増殖刺激を受けた心筋細胞において、D型サイクリン及びCDK4はいずれも核内には存在せず、細胞質でのみ発現していた。一方、増殖刺激を受けたREF52細胞においては、サイクリンD1、D3及びCDK4が核内に移行していた。RBタンパク質は心筋細胞およびREF52共に核内に存在した。

図3は、ウシ胎児血清(FCS)又は組換えアデノウイルスAd-RAS61Lで増殖刺激した心筋細胞を、マウス抗sarcomericアクチンモノクローナル抗体を用いて免疫蛍光染色した顕微鏡写真である。いずれの場合もサイクリンD1が細胞質に蓄積していることが分かる。

更に、図4は、アデノウイルスAd-D1とAd-CDK4によって野生型サイクリンD1とCDK4を過剰発現させてもサイクリンD1は核内に蓄積しないことを示す。従って、核移行シグナル(NLS)の付加されたサイクリンD1遺伝子を含む組換えアデノウイルスAd-D1NLSを構築した。図4及び図5に示したように、このAd-D1NLSとAd-CDK4を共感染させると、心筋細胞の核内でサイクリンD1とCDK4が強く発現していることが分かった。なお、ヒトサイクリンD1を発現させるアデノウイルスAd-D1は、Minneapolis Medical Research FoundationのAlbrecht, J.博士より入手した (Albrecht, J. H.ら、Cell Growth & Differentiation、10巻、397-404頁、1999年参照)。

細胞周期をG1期からS期に移行させるためにはD型サイクリンとCDK4と

の複合体が核内に入りそこでCDK4がCDK活性化キナーゼ(CAK)によるリン酸化を受けなければならない(Sherr, C. J. ら、Genes and Dev. 1999年参照)。従って、次に、このように核内で発現したサイクリンD1およびCDK4がRBをリン酸化して細胞周期を進行させるかどうかについて調べた。図6は
5 Ad-D1NLSとAd-CDK4の共感染によって心筋細胞の核内でRBがリン酸化されていることを示す。図6において、CDKインヒビターであるp16やp21タンパク質を発現するアデノウイルスベクター(Ad-p16及びAd-p21)を上記Ad-D1NLS/Ad-CDK4と共に感染させるとRBのリン酸化が阻害されることから、Ad-D1NLS/Ad-CDK4の感染によるRBのリン酸化は、サイクリン依存性キナーゼの活性に依存していることが確認される。また、図7はRB/E2FのターゲットであるサイクリンAやサイクリンEが心筋細胞の核内で発現していることを示す。これらの結果は、核内におけるサイクリンD1/CDK4の活性がRBをリン酸化し、細胞周期を進行させる可能性を示唆する。
10
15

[実施例4] 細胞周期の解析

次に細胞周期の解析を行うため、実施例1で調製した組換えアデノウイルスを、実施例2で調製したラット心筋細胞に感染させ、種々の時間経過後に、直径25
mmカバースリップガラス上で70%エタノールにより固定し、DNA含量を測定するためヨウ化プロピジウム(PI; propidium iodide)で染色した。即ち、エタノールで固定した細胞をフルオレセインイソチオシアネート(FITC)にて標識した抗sarcomeric actin抗体(1:1000)を加え、PBSにて洗った後、PI 50 μg/ml, RNase A 500 μg/mlを加え、37°C、15分間、更に室温で15分間静置した後、各細胞の細胞周期における位置をレーザースキャニングサイトメーター(LSC、オリンパス社製)により検出した。心筋細胞は、上記抗sarcomeric actin抗体による二重染色によって確認した。
20
25

図8は、LSCによる細胞周期の解析結果を示した。図8aは種々のウイルス感染又は増殖因子によって刺激された心筋細胞を一定時間経過後の細胞の分布状態(DNA含量と細胞数の関係)を示したものである。無血清培地でAd-D1NLS/Ad-CDK4を共感染させた心筋細胞(D1NLS/CDK4)は、時間経過と共にS期及びG2

期に移行していることがDNA含量の変化から推測される。更に5%の牛血清を添加した細胞(5%CS+D1NLS/CDK4)では、無血清の条件に比べてこの細胞周期の進行は加速される。これに対し、血清刺激(10%FCS)又は核移行シグナルのないサイクリンD1を含むAd-D1/Ad-CDK4に感染した心筋細胞(D1/CDK4)は、ほとんど細胞周期が進行していないことが分かる。5%牛血清のみ(5%CS)ではG1期にとどまつたままである。これらの結果は、Ad-D1NLS/Ad-CDK4の共感染によって心筋細胞の細胞周期が進行していることを示している。

更に、細胞周期の進行を起こした細胞の割合を確認するため、細胞周期をG2期で停止させる抗生物質であるノコダゾール(シグマ社製)を添加してLSCによる解析結果を図8bに示した。この結果から、ノコダゾール(50 ng/ml)を添加して培養したAd-D1NLS/Ad-CDK4の共感染心筋細胞(D1NLS/CDK4+Nocodazole)はほとんどの細胞がS期及びG2/M期にあることが分かる。従って、Ad-D1NLS/Ad-CDK4によって共感染させた心筋細胞のほとんどが細胞周期の進行を起こしたことが示唆される。G2/M期に同調培養された心筋細胞からノコダゾールを除去するとこれらの細胞は再びG1期に入ることが分かる(post Nocodazole wash out)。これらの結果は、核内において発現したサイクリンD1/CDK4がS期誘導だけでなく、細胞分裂も誘導し、心筋細胞の完全な細胞周期の進行を起こすことを示している。

図9は、共焦点レーザー顕微鏡(confocal laser microscope)を備えたレーザースキャンサイトメーター(LSC；オリンパス社製、日本)により、Ad-D1NLS/Ad-CDK4を共感染させ48時間後の心筋細胞を撮影したものである。図9aには、有糸分裂中の又は、有糸分裂直後の細胞が確認される。各細胞の細胞周期位置はPI染色により計測したDNA含量(PIの蛍光量)とPI蛍光強度のピーク(最大値)で決定した。DNA複製を起こした細胞は、そのDNA含量(PIの蛍光量)が増加し、一方、分裂直前、直後の細胞はDNAが凝集するためPI蛍光強度が高くなる(明るくなる)ことを指標として、顕微鏡写真の中の個々の細胞(1～27の番号を付した)を、その細胞周期位置(G1～M期)によってa～fに分類した(図9b)。その結果、G1～M期の各位置の細胞が混在し、細胞分裂中及び分裂した細胞が多数観察された。

図10は、これらの細胞数をコールターカウンター（細胞数計測器）で計測した結果を相対的に示したものである。Ad-D1NLS/Ad-CDK4を共感染させ培養した心筋細胞の細胞数は、5日後には約3倍に増加していることが分かる。これに対し、対照としてベクターのみのアデノウイルスを感染させた心筋細胞はほとんど細胞数の増加は認められなかった。

[実施例5] 生体内における心筋細胞の増殖可能性の検討

サイクリンD1とCDK4の核内への移行が、生体内における心筋細胞の増殖を起こすかどうかを確認するため、実施例1及び2で作製したAd-D1NLSとAd-CDK4の2種類のアデノウイルスを、ウイスター系ラット（250～300g）を開胸して目視にて心尖部（apical region）に注入した。対照としてlacZ遺伝子を含むアデノウイルスも同様に行った。注入後4日間経過後、4%パラホルムアルデヒドを灌流して心臓細胞を固定化し、心臓組織の切片をウサギ抗Ki-67抗体及びマウス抗sarcomeric actin抗体で標識した。標識された抗体は抗ウサギAlexa488抗体又は抗マウスAlexa568抗体（何れもMolecular Probes社）を用いてそれぞれ緑色及び赤色に染色視覚化した。視覚化された画像は、レーザースキャニング共焦点イメージシステム（ZEISS社 LSM510）を用いて観察し、その結果を図11に示した。図11において、赤色はsarcomeric actinを示し、緑色はKi-67を示す。

Ki-67核タンパク質は細胞周期のすべてのサイクルにおいて増殖している細胞で発現することから（Scholzenら、J. Cell. Physiol., 182巻、311-322頁、2000年参照）、細胞周期が進行している細胞を検出するために用いた。Ad-D1NLSとAd-CDK4の2種類のアデノウイルスを共感染させた心臓切片の画像（図11a及びb）では、多くの心筋細胞及び非心筋細胞において、Ki-67核タンパク質が発現していることが分かった。一方、lacZ遺伝子を含むアデノウイルスを注射した心筋細胞ではKi-67核タンパク質の発現は認められなかった（図11c）。これらの結果より、生体内においても、サイクリンD1とCDK4の核内への移行が心筋細胞の細胞周期を進行させることが示唆された。

以上の結果より、サイクリンD1／CDK4活性を核内で発現させた心筋細胞は明らかに増殖能を獲得したことが理解される。

産業上の利用可能性

本発明の方法によれば、終末分化した細胞の細胞分裂を誘導し、細胞を増殖させて移植用の細胞や組織をつくることができる。特に心筋細胞、神経細胞、腎臓細胞及び胰臓細胞等の終末分化した細胞自身を増殖させることによって、ES細胞等の未分化細胞を分化誘導させる場合と比べてより安全かつ確実な再生医療への利用が期待される。

請求の範囲

- 1 サイクリン及びサイクリン依存性キナーゼを終末分化細胞の核内に導入し、次いでその細胞を培養又は保持することを特徴とする終末分化細胞の増殖方法。
- 2 サイクリン遺伝子及びサイクリン依存性キナーゼ遺伝子の少なくとも一方に核移行シグナルをコードする塩基配列を付加し、前記各遺伝子を試験管内で終末分化細胞に導入し次いでその細胞を培養するか、又は前記各遺伝子を生体内の終末分化細胞に直接導入することを特徴とする終末分化細胞の増殖方法。
- 3 前記サイクリンは哺乳類のCDK 4又はCDK 6を活性化し得るサイクリンであることを特徴とする請求の範囲第1項又は第2項に記載の方法。
- 4 前記サイクリン依存性キナーゼは哺乳類のサイクリンD 1、D 2又はD 3により活性化されるサイクリン依存性キナーゼであることを特徴とする請求の範囲第1項～第3項の何れか記載の方法。
- 5 前記終末分化細胞は心筋細胞、神経細胞、腎臓細胞又は臍臓細胞であることを特徴とする請求の範囲第1項～第4項の何れか記載の方法。
- 6 前記終末分化細胞への遺伝子の導入はアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入であることを特徴とする請求の範囲第2項～第5項の何れか記載の方法。
- 7 核移行シグナルをコードする塩基配列を付加した、サイクリン遺伝子又はサイクリン依存性キナーゼ遺伝子を含むことを特徴とする組換えベクター。
- 8 サイクリン遺伝子とサイクリン依存性キナーゼ遺伝子とを含む組換えベクターであって、これらの遺伝子のうち少なくとも一方に核移行シグナルをコードする塩基配列を付加したことを特徴とする組換えベクター。

9 前記サイクリン遺伝子は哺乳類のCDK 4又はCDK 6を活性化し得るサイクリン遺伝子であることを特徴とする請求の範囲第7項又は第8項に記載の組換えベクター。

10 前記サイクリン依存性キナーゼ遺伝子は哺乳類のサイクリンD1、D2又はD3によって活性化されるサイクリン依存性キナーゼ遺伝子であることを特徴とする請求の範囲第7項又は第8項に記載の組換えベクター。

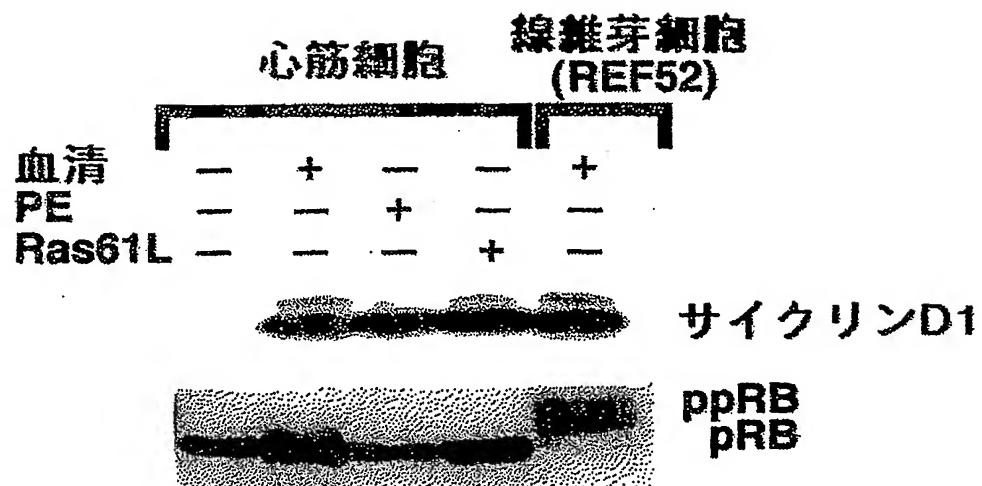
11 前記組換えベクターはアデノウイルスベクターであることを特徴とする請求の範囲第7項～第11項の何れか記載の組換えベクター。

12 請求の範囲第1項～第6項の何れか記載の方法により増殖させたことを特徴とする動物細胞又は組織。

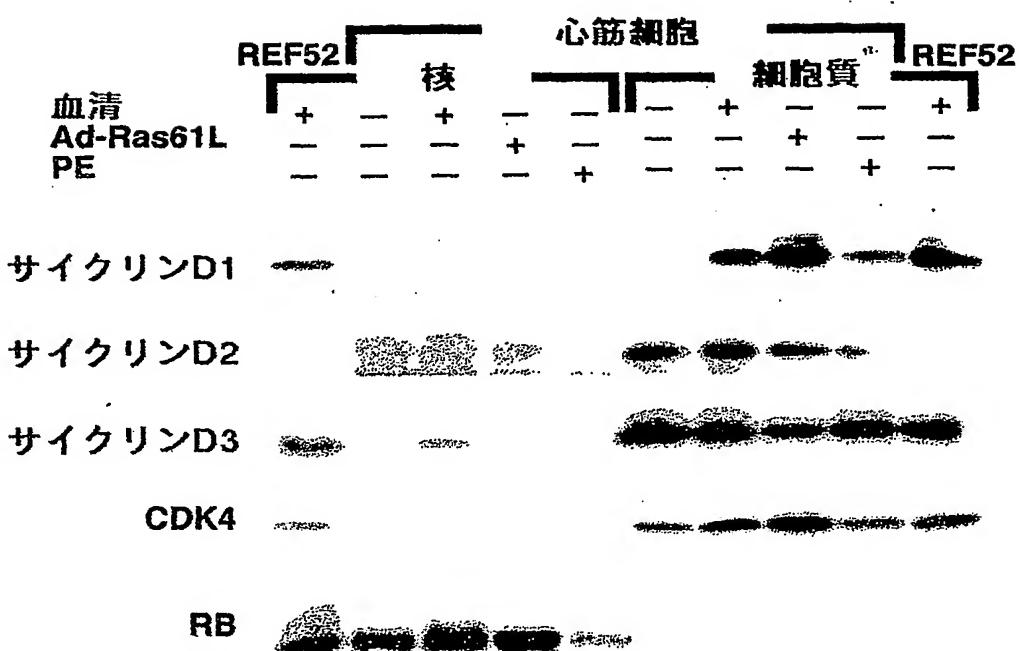
13 請求の範囲第7項～第11項の何れか記載の組換えベクターを有効成分とすることを特徴とする終末分化した細胞及び／又は組織を増殖させるための薬剤。

14 心臓疾患を有する患者の治療方法であって、請求の範囲第13項に記載の薬剤を直接患者の心筋に投与し、患者の心筋を増殖させることを特徴とする心臓疾患の治療方法。

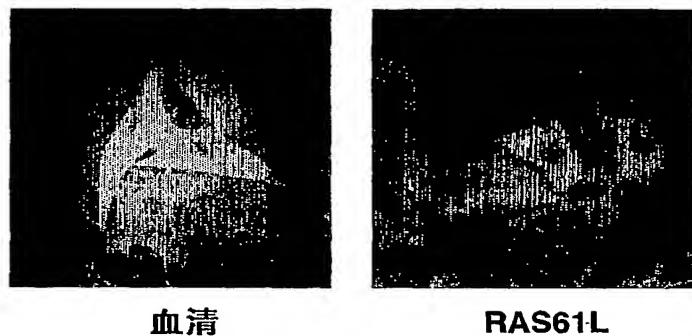
【図1】



【図2】



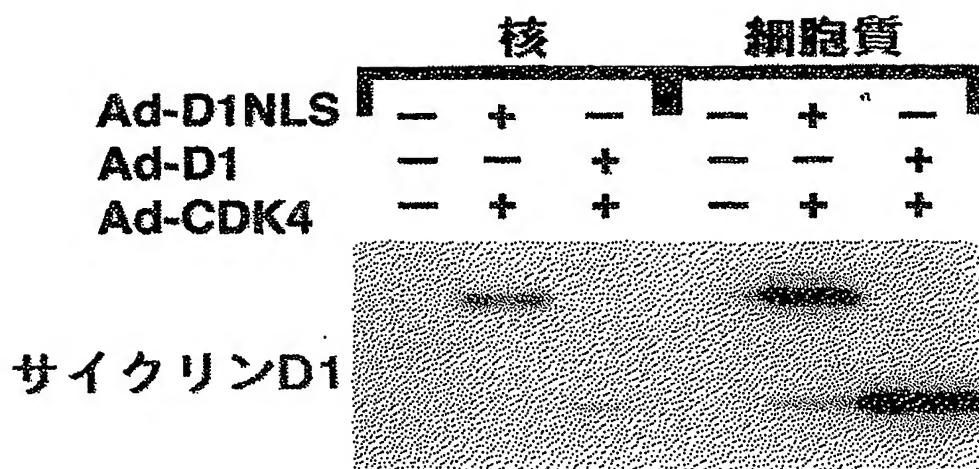
【図3】



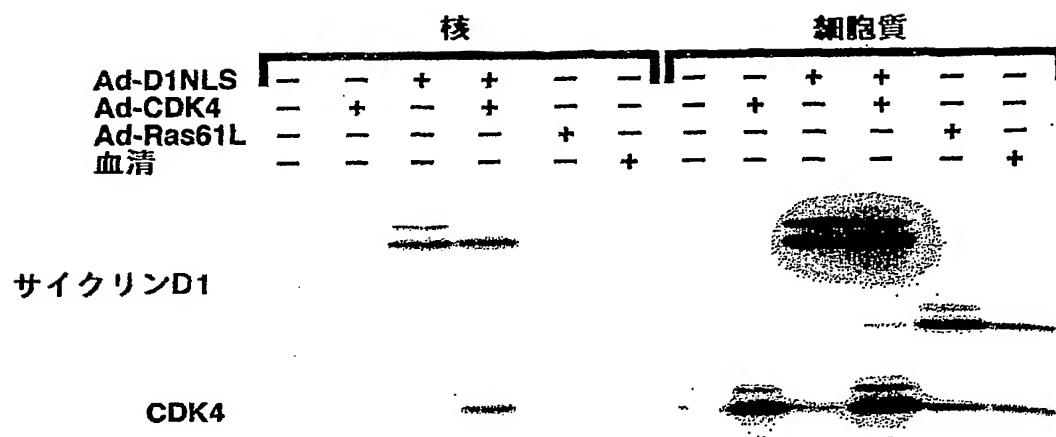
血清

RAS61L

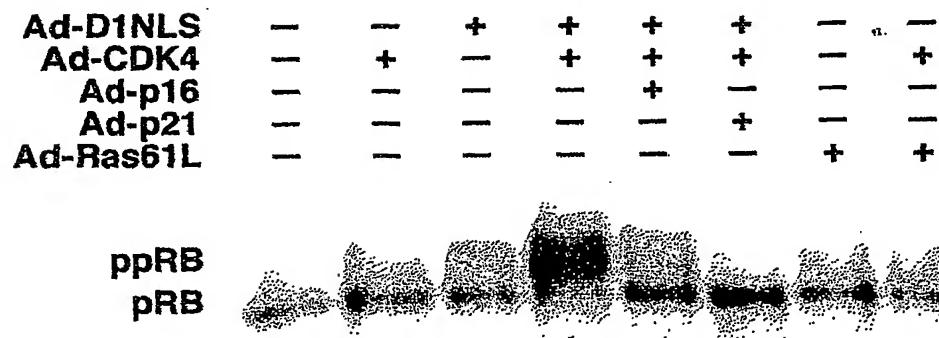
【図4】



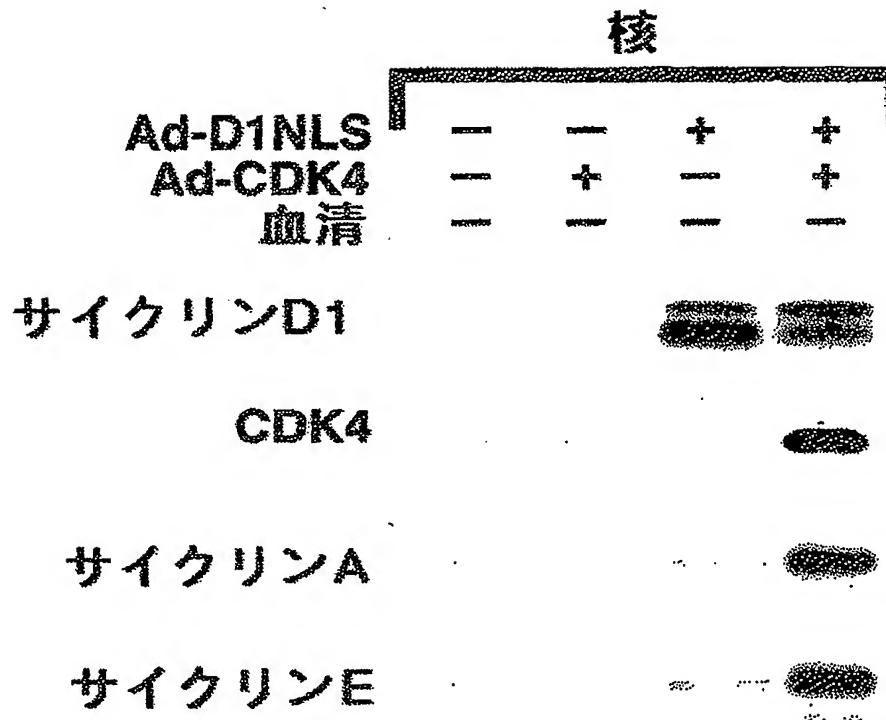
【図5】



【図6】

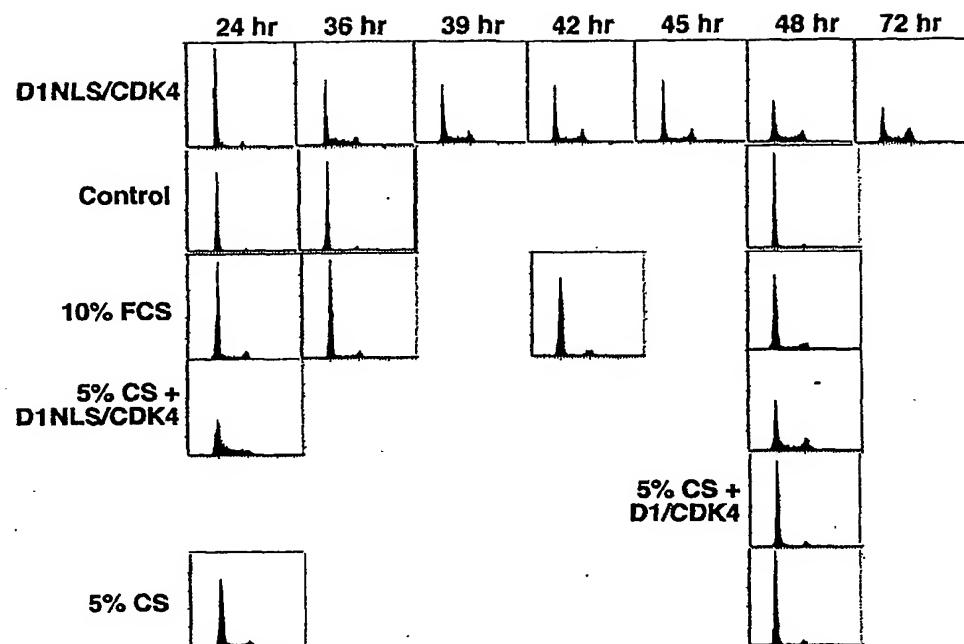


【図7】

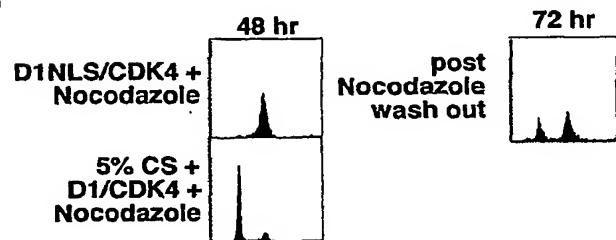


[図 8]

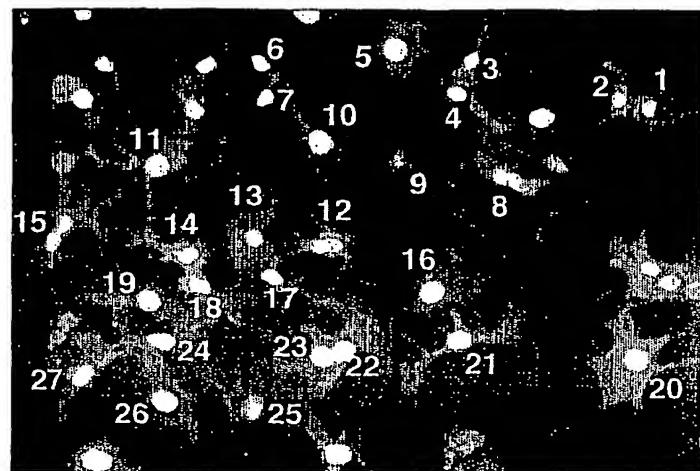
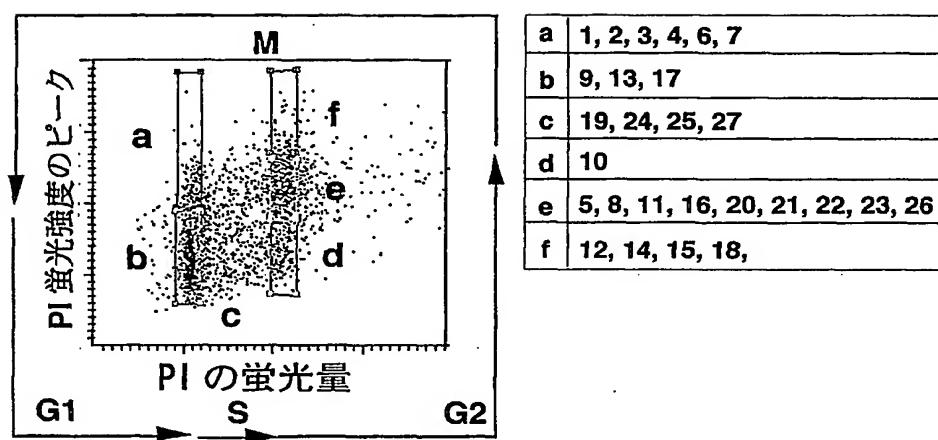
a



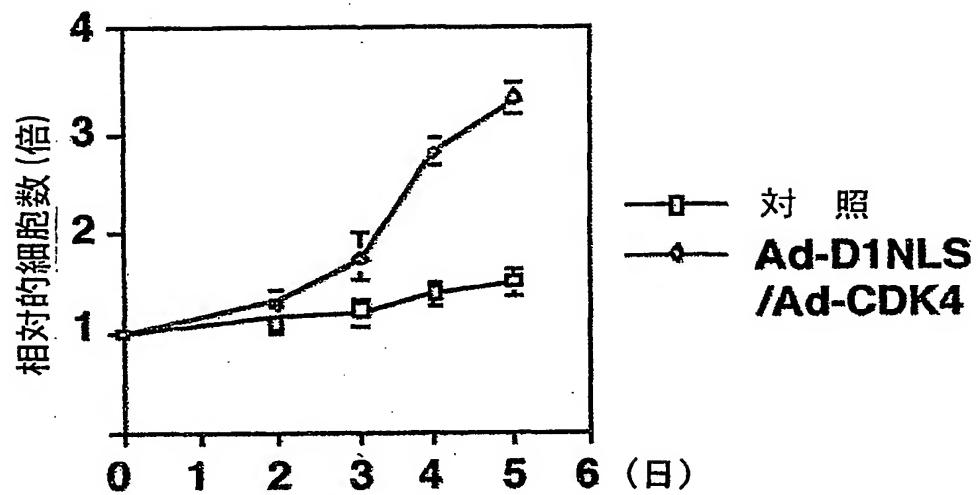
b



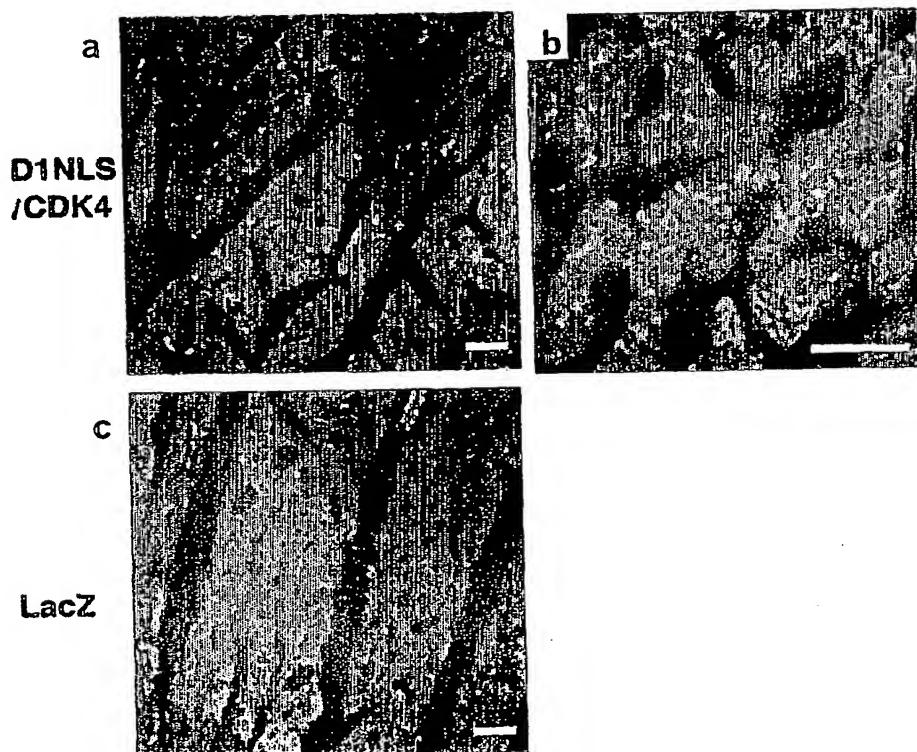
【図9】

a**b**

【図10】



【図11】



SEQUENCE LISTING

<110> Ikeda, Masaaki
Adachi, Mimi
Banyu Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Methods for proliferating a terminal differentiated cell
and a recombinant vector therefor

<130> P2679PCT-GN

<140>
<141>

<150> JP P2001-148266

<151> 2001-05-17

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Influenza virus

<400> 1
Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser

1 5 10

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Simian virus 40

<400> 2

Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1 5

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Xenopus laevis

<400> 3

Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys

1 5 10 15

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: NcoI primer

<400> 4

accctccatg gtagctgctg gga

23

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: XhoI primer

<400> 5

tgatctcgag gtcgatgtcc acatctcgca cgt

33

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2001年09月20日 (20.09.2001) 木曜日 17時07分47秒

P2679PCT-CN

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v) 及び51の2.1(a)(v))	本国際出願に關し、 萬有製薬株式会社は、 本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1 (i)	開示の種類	その他: 講演発表
VIII-5-1 (ii)	開示の日付:	2000年12月14日 (14.12.2000)
VIII-5-1 (iii)	開示の名称:	第23回日本分子生物学会年会
VIII-5-1 (iv)	開示の場所:	神戸国際展示場 PC会場
VIII-5-1 (i)	開示の種類	刊行物
VIII-5-1 (ii)	開示の日付:	2000年11月25日 (25.11.2000)
VIII-5-1 (iii)	開示の名称:	第23回日本分子生物学会年会講演要旨集
VIII-5-1 (iv)	開示の場所:	日本分子生物学会
VIII-5-1 (v)	本申立ては、次の指定国のために になされたものである。:	国内特許又は広域特許のためのJPの指定

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08208

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, 15/861, 5/10, A61K35/76, 38/17, 48/00, A61P43/00, 9/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, 15/861, 5/10, A61K35/76, 38/17, 48/00, A61P43/00, 9/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG) BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Mark H.SOONPAA et al., Cyclin D1 Overexpression Promotes Cardiomyocyte DNA Synthesis and Multinucleation in Transgenic Mice, J. Clin. Invest., (June 1997), Vol.99, No.11, pp.2644-2654	1-13
A	Charles J.SHERR et al. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. GENES & DEVELOPMENT, (1999), Vol.13, pp.1501-1512	1-13
A	Gavin BROOKS et al., Arresting developments in the cardiac myocyte cell cycle: Role of cyclin-dependent kinase inhibitors, Cardiovascular Research (1997), Vol.39, pp.301-311	1-13
A	Hitoshi MATSUSHIME et al., Colony-Stimulating Factor 1 Regulates Novel Cyclins during the G1 Phase of the Cell Cycle, Cell (1991), Vol.65, pp.701-713	1-13
A	Kalderon D et al., Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen, Nature (1984), Vol.311, No.5981, pp.33-38	1-13

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* "A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search 17 October, 2001 (17.10.01)	Date of mailing of the international search report 30 October, 2001 (30.10.01)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08208

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 14
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The invention as set forth in the above claim pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/09, 15/861, 5/10, A61K35/76, 38/17, 48/00, A61P43/00, 9/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/09, 15/861, 5/10, A61K35/76, 38/17, 48/00, A61P43/00, 9/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI(DIALOG) BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Mark H. SOONPAA et al., Cyclin D1 Overexpression Promotes Cardiomyocyte DNA Synthesis and Multinucleation in Transgenic Mice, J. Clin. Invest, (June 1997), Vol. 99, No. 11, p. 2644-2654	1-13
A	Charles J. SHERR et al. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G ₁ -phase progression. GENES & DEVELOPMENT, (1999), Vol. 13, p. 1501-1512	1-13

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 17.10.01	国際調査報告の発送日 30.10.01
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 光本 美奈子 4B 2936 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Gavin BROOKS et al., Arresting developments in the cardiac myocyte cell cycle: Role of cyclin-dependent kinase inhibitors, <i>Cardiovascular Research</i> (1997), Vol. 39, p. 301-311	1-13
A	Hitoshi MATSUSHIME et al., Colony-Stimulating Factor 1 Regulates Novel Cyclins during the G1 Phase of the Cell Cycle, <i>Cell</i> (1991), Vol. 65, p. 701-713	1-13
A	Kalderon D et al., Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen, <i>Nature</i> (1984), Vol. 311, No. 5981, p. 33-38	1-13

第一欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 14 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
前記請求の範囲に記載された発明は、人の身体の治療による処置方法に係る発明であるから、国際調査を要しないものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第二欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかつた。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつた。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかつた。